

EFICIENȚA METODELOR EXOGENE DE PREVENIRE A CARIEI DENTARE LA ANIMALELE DE LABORATOR

Rezumat

Studiile preclinice constituie o etapă importantă pentru aprecierea eficienței noilor metode de tratament și control al cariei dentare și de a identifica procedeele terapeutice care vor fi utilizate ulterior în studiile clinice. **Scopul:** modelarea experimentală a cariei dentare și evaluarea eficienței utilizării metodelor exogene de prevenirea cariei dentare la animalele de laborator. **Materiale și metode.** Studiul a fost efectuat pe un eșantion de 360 șobolani albi (Rata albicans). Modelul experimental care a inclus 4 serii de experiențe, în fiecare lot au fost incluși câte 30 de animale. S-a modelat caria dentară după metoda descrisă de Muller, K. P. și coaut., 2007. Impactul modelării cariei dentare și eficiența măsurilor cariopreventive au fost evaluate prin estimarea frecvenței cariei dentare, numărului cavităților și suprafețelor afectate de carie per animal și a determinarea rugozității de suprafață a smalțului dentar. Pentru studiul microstructurii și morfologiei smalțului molarilor animalelor de laborator, au fost folosite metodele de microscopie electronică cu scanare. S-a analizat rugozitatea de suprafață a probelor de smalț, prin metoda de *microscopie cu forțe atomice*. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu”. Analiza datelor a fost realizată utilizând programele EXCEL și SPSS 16.0 cu ajutorul funcțiilor și modulelor acestor programe. **Rezultate.** Efectul cariopreventiv suficient, a fost estimat în urma efectuării terapiei fotodinamice antimicrobiene (TFDA), indicele de reducere (IR) a cariei dentare fiind mai mare de 80%. Cele mai eficiente metode care au contribuit la reducerea maximă a cariei dentare au fost efectuarea TFDA cu aplicarea simultană a nanofluorurilor, IR=88,61%. **Concluzii.** În cadrul studiului experimental efectuat pe animale de laborator, s-a demonstrat efectul cariopreventiv superior al efectuării TFDA simultan cu aplicarea topică a nanofluorurilor (IR>85%), fapt care justifică oportunitatea implementării ulterioare a acestei metode în condiții clinice.

Cuvinte cheie: carie experimentală, terapie fotodinamică antimicrobiană, nanofluoruri.

Aurelia Spinei,
conferențiar universitar

Catedra de chirurgie
OMF, pedodonție și
ortodonție, USMF
„Nicolae Testemițanu“

Summary

THE EFFICIENCY OF EXOGENOUS METHODS FOR PREVENTION TOOTH DECAY IN LABORATORY ANIMALS

Preclinical studies are an important stage for assessing the effectiveness of new methods of treatment and control of dental caries. They are also useful for identifying therapeutic procedures, that will be used in clinical trials. **Objective:** Experimental modeling and evaluating the effectiveness of dental caries prevention using exogenous methods of dental caries in laboratory animals. **Materials and methods:** The study was conducted on a sample of 360 white rats (Rata Albicans). The experimental model that included four series of experiments, were included in each batch of 30 animals each. Dental decay was modeled as described by Muller, KP and co., 2007. The impact modeling of dental caries and effectiveness of caries preventive measures were evaluated by determining the rate of dental decay, the number of cavities and surfaces affected per animal and the roughness of the enamel surface. To study the microstructure and morphology of enamel molars laboratory animals, were used methods of scanning electron microscopy. Samples of surface roughness of the enamel were analyzed by means of atomic force microscopy. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Medical University „Nicolae Testemițanu”. Data analysis was performed using SPSS 16.0 and EXCEL programs. **Results.** The suffi-

cient effect of caries prevention was estimated from making antimicrobial photodynamic therapy (APDT) reduction index (RI) of dental caries being greater than 80%. The most effective methods that have helped reduce dental caries was making APDT with simultaneous application of nanofluorides, RI=88.61%.

Conclusions. In the current experimental study conducted on laboratory animals was demonstrated the effect of caries prevention through making APDT simultaneously with topical application of nanofluorides (RI>85%), justifying the implementation of this method in the clinical practice.

Key words: *experimental caries, antimicrobial photodynamic therapy, nanofluorides.*

Introducere

Conceptul de minima intervenție este o strategie cheie în practica stomatologică modernă și a dus la schimbarea paradigmei în stomatologie. În baza cunoștințelor actuale, managementul modern al cariei dentare include manopere neinvazive pentru restabilirea (remineralizarea) țesuturilor demineralizate, principiul de bază fiind prioritatea pentru crearea condițiilor favorabile remineralizării leziunilor carioase incipiente printr-o abordare biologică sau terapeutică, în raport cu tratamentul restaurativ tradițional [1, 2]. Acest model s-a impus grație abordării leziunii carioase ca o boală infecțioasă pluricausală și nu ca o simplă leziune odontală. El cuprinde ca măsuri profilactice dispensarizarea, sigilarea fisurilor, aplicațiile topice ale preparatelor fluorurate, etc., iar din punct de vedere curativo-terapeutic, restaurarea conservativă a leziunii cavitare prin obturații de durată sau incrustații [2]. În acest context este actuală elaborarea unor metode cariopreventive noi sau modificarea celor cunoscute deja, pentru majorarea eficienței în evitarea apariției noilor cavități carioase.

Studiile preclinice constituie o etapă importantă pentru aprecierea eficienței noilor metode de tratament și control al cariei dentare și de a identifica procedeele terapeutice care vor fi utilizate ulterior în studiile clinice. Modelarea experimentală a proceselor patologice, inclusiv a cariei dentare este utilizată frecvent în cercetările actuale biomedicale, având avantajul unor explorări la nivel de țesut și structuri subcelulare. Investigațiile în cariologia experimentală contribuie atât la cunoașterea mecanismelor care participă în apariția leziunilor carioase, cât și la elaborarea direcțiilor noi în prevenirea și tratamentul acestei afecțiuni. Conform viziunii mai multor autori, modelarea experimentală a cariei dentare prin influența celor mai frecvenți factori de risc (numărul mare a bacteriilor acidogene în biofilmul dentar, nerespectarea igienei orale și alimentația bogată în glucide rafinate) creează în condiții de laborator circumstanțe similare evoluției cariei dentare la copii [3-9]. În această lucrare ne-am propus să studiem în condiții experimentale

oportunitățile de aplicare clinică a mai multor metode exogene de prevenire a cariei dentare și majorarea eficienței acestora.

Scopul: modelarea experimentală a cariei dentare și evaluarea eficienței utilizării metodelor exogene de prevenire a cariei dentare la animalele de laborator.

Materiale și metode

În conformitate cu obiectivele de cercetare propuse, studiul a fost efectuat pe un eșantion de 360 șobolani albi (Rata albicans). Necesitatea utilizării animalelor de laborator în prezentul studiu în favoarea altor metode alternative de cercetare (cultură celulară, simulare computerizată, cercetări clinice pe oameni) este fundamentată de următorii factori:

- modelarea și studierea evoluției cariei dentare în modul care este inaccesibil la pacienții umani, efectuarea de proceduri care eventual pot implica unele prejudicii ce nu ar fi considerate etice a fi produse pe om,
- evaluarea eficienței cariopreventive a dispozitivelor emițătoare de lumină laser IR și LED, a preparatelor autohtone noi și a efectelor lor asupra țesuturilor cavității orale, constatarea efectelor adverse sau complicațiilor posibile, necunoscute la momentul actual.

Fundamentarea alegerii speciei de animale necesare pentru experiențe:

- Structura țesuturilor dentare, etapele de formare a procesului carios și profunzimea de afectare a țesuturilor dentare la **șobolani** sunt similare cu evoluția cariei dentare la ființele umane [8, 9], fapt ce justifică utilizarea acestor animale în modelarea experimentală a inducerii cariei dentare și evaluarea eficienței aplicării diferitor metode de prevenire a acestei afecțiuni.
- Costul redus, rata crescută de reproducere și manipularea simplă a animalelor au influențat alegerea șobolanilor albi (Rata albicans) pentru experiențele preconizate în prezentul studiu.

În conformitate cu obiectivele de cercetare propuse, a fost elaborat modelul experimental care a inclus 4 serii de experiențe (Tab.1). În fiecare lot au fost incluși câte 30 șobolani albi, ceea ce constituie numărul minim necesar pentru a realiza obiectivele trasate și a obține rezultate statistic semnificative.

În prima serie de experiențe s-a modelat caria dentară prin administrarea zilnică a unui rațion alimentar special, cariogencare conține 54% glucide rafinate [5]. Pentru a majora efectul cariogen, șobolanii au primit sol. zaharoză 10% de *ad libitum* [4]. În decursul primelor trei zile consecutive, animalele au fost infectate pe cale orală cu suspensie care conține *S. mutans* $\times 10^7$ după metoda descrisă de Muller, K. P. și coaut., 2007 [5].

Dieta cariogenă a fost administrată pe parcursul întregului experiment. Animalele din toate loturile experimentale, cu excepția lotului de control (L_0) au fost

Tab.1. Metodologia efectuării serilor de experiențe pe animale de laborator

Seria	Lotul	Numărul de animale	Modelarea cariei dentare	Metodologia efectuării experiențelor
I	L ₀	30	-	Lotul de control — rația alimentară standardă a vivariului
	L ₁	30	+	Administrarea dietei cariogene și infectarea cu tulpine cariogene — zilnic
II	L ₂	30	+	Aplicarea topică a 0,1 ml suspensie de nanoparticule de dioxid de titan 1% — 1/săptămână
	L ₃	30	+	Aplicarea topică a 0,5 ml extract antocianic 5,0 % — 1/săptămână
	L ₄	30	+	Aplicarea topică a 0,1 ml soluție Biomineralizantă SnF ₂ 1,0% — 1/săptămână
	L ₅	30	+	Aplicarea topică a preparatului Gluflored — 1/săptămână
III	L ₆	30	+	Iradierea suprafețelor dentare cu lumină LED <i>FotoSan 630</i> cu emisia $\lambda = 625-635 \text{ nm}$ — 1/săptămână
	L ₇	30	+	Iradierea suprafețelor dentare cu lumină laser <i>Optodan</i> , $\lambda = 850-980 \text{ nm}$ (LIR), 60 s — 1/săptămână
IV	L ₈	30	+	Efectuarea TFDA: agent de fotosensibilizare (AF) — 0,1 ml extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0); sursă de lumină (SL) — emițător de lumină LED <i>FotoSan 630</i> , cu emisia $\lambda = 625-635 \text{ nm}$ — 1/săptămână
	L ₉	30	+	Efectuarea TFDA (AF — 0,1 ml extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0); SL — emițător de lumină LED <i>FotoSan 630</i> , $\lambda = 625-635 \text{ nm}$) simultan cu aplicarea topică a preparatului Gluflored — 1/săptămână
	L ₁₀	30	+	Efectuarea TFDA: AF- 0,1 ml gel <i>FotoSan AgentLow</i> care conține albastru de toluidină, SL — emițător de lumină LED <i>FotoSan 630</i> , $\lambda = 625-635 \text{ nm}$ — 1/săptămână
	L ₁₁	30	+	Efectuarea TFDA (AF — 0,1 ml gel <i>FotoSan AgentLow</i> ; SL — emițător de lumină LED <i>FotoSan 630</i> , $\lambda = 625-635 \text{ nm}$) simultan cu aplicarea topică a preparatului Gluflored — 1/săptămână

deprive pe toată perioada studiului de alimentele care favorizează autocurățirea dinților (boabe de grâu, fructe și legume) și suplimentele administrate în cadrul vivariului pentru prevenirea cariei dentare.

Experimentele au fost conduse în conformitate cu recomandările Comitetului de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, fiind respectate „principiul celor 3R” adoptat de Congresul Internațional de Standardizare Biologică în 1979 [6] și exprimă preocupările cercetătorilor din toată lumea privind standardizarea experiențelor pe animale care să contribuie la:

replacement — înlocuirea experiențelor pe animale vertebrate prin teste biologice, atunci când acestea permit extrapolarea rezultatelor obținute la animalele vii;

reduction — reducerea numărului animalelor utilizate în experiențe la strictul necesar, astfel încât să se atingă limita minimă pentru prelucrarea statistică a datelor;

refinement — perfectarea procedurilor și tehnicilor experimentale pentru diminuarea suferințelor animalelor și „umanizarea” experiențelor [6].

Pe întreaga durată a studiului animalele au fost întreținute în vivariul USMF „Nicolae Testemițanu”. Spațiile vivariului permit separarea activităților: întreținerea, carantina și realizarea procedurilor experimentale. Animalele au fost întreținute în condiții standarde, hrana și apa au fost accesibile *ad libitum*. Starea de sănătate a animalelor a fost monitorizată zilnic de veterinarul vivariului. Animalele nu au fost supuse unor manipulări ce provoacă durere, stres sau disconfort de durată, nu au produs dereglări substanțiale ale unor funcții și nu au necesitat anestezie sau analgezie. În decursul manipulărilor efectuate anima-

lele au fost fixate manual de asistent fără a aplica un efort excesiv. Până la sfârșitul studiului animalele au fost asigurate cu hrană și apă și au primit îngrijirea standardă. Eutanasierea animalelor a fost efectuată (într-o încăpere separată pentru a nu provoca agitație și stres celorlalte animale până la sacrificare) prin inhalarea dozei letale a substanței pentru narcoză [6]. După constatarea morții animalelor de veterinar, s-a efectuat decapitarea lor, colectarea sângelui și preluarea materialului biologic pentru cercetarea parametrilor morfologici.

Impactul modelării cariei dentare (seria I) și eficiența măsurilor cariopreventive (seriile II-IV) au fost evaluate prin estimarea frecvenței cariei dentare, numărului cavitațiilor și suprafețelor afectate de carie per animal și determinarea rugozității de suprafață a smalțului dentar. Pentru studiul microstructurii și morfologiei smalțului molarilor animalelor de laborator, au fost folosite metodele de microscopie electronică cu scanare cu utilizarea echipamentului VEGA TESCAN TS 5130 MM. S-a analizat rugozitatea de suprafață a probelor de smalț, efectuând scanarea tridimensională prin metoda de *microscopie* cu *forțe* atomice AFM (Atomic Force Microscopy), rezultatele fiind exprimate ca valoare a rugozității pătratică. Cercetările au fost efectuate în baza Centrului Național de Cercetare și Testare a Materialelor a Universității Tehnice a Moldovei.

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu” (aviz pozitiv din 14. 11. 2011). Analiza datelor a fost realizată utilizând programele EXCEL și SPSS 16.0 cu ajutorul funcțiilor și modulelor acestor programe.

Rezultate și discuții

În cadrul acestui compartiment al studiului s-a evaluat eficiența diferitor metode de prevenire a cariei dentare la animalele de laborator. După 60 de zile de observație la 96,67±3,28 % din șobolanii din lotul de control nu s-au depistat cavități carioase sau zone de demineralizare a smalțului dentar (Fig.1-2). În urma modelării cariei dentare prin administrarea dietei cariogene și infectarea cavității orale cu suspensia care conține cultură de tulpini cariogene, după 60 de zile, la majoritatea animalelor s-au depistat cavități carioase sau zone de demineralizare a smalțului dentar (Fig.4—6). Astfel, frecvența cariei dentare la animalele din L_1 a constituit 93,33±4,55% spre deosebire de depistarea a unei singure cavități (3,33±3,28 %) în lotul de control (L_0).

Tab. 2. Gradul de afectare prin caria dentară și rugozitatea smalțului dentar animalelor de laborator în rezultatul modelării cariei dentare

Loturile de animale	Frecvența cariei dentare P±ES%	Nr cavități carioase / animal, M±ES	Nr suprafețe cariate / animal, M±ES	Rugozitatea (μm), M±ES
L_0	3,33±3,28	0,03±0,033	0,03±0,033	1,17±0,084
L_1	93,33±4,55	4,10±0,366***	5,2±0,530***	6,47±0,481***

Notă:

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul de control L_0 :
* — $p<0,05$; ** — $p<0,01$; *** — $p<0,001$.

Cercetarea electronoptică a suprafeței smalțului dentar la animalele de laborator din lotul de control (L_0) denotă un relief granulos slab evidențiat. Pe unele sectoare se determină microcratere, microprotuberanțe, cristale de formă și dimensiuni diferite și microfisuri (Fig.3). În unele cazuri, se observă microcratere și protuberanțe izolate sau grupate, care corespund capetelor prismelor de smalț. În probele de smalț preluate de la animalele de laborator din lotul martor s-au depistat multiple zone de demineralizare a smalțului, care au un relief neregulat, caracterizat de prezența în abundență a microporilor și dezorganizarea cristalelor de hidroxiapatită (Fig.7), pe unele electronograme se observă creșterea numărului de cratere, fapt care ilustrează majorarea porozității smalțului (Figurile 7-10). La scanarea tridimensională a probelor de smalț s-a constatat creșterea semnificativă a rugozității de suprafață de la o medie a valorilor rugozității de 1,17±0,084 μm în L_0 (Fig.3), valorile cresc la 6,47±0,481 μm ($p<0,001$) în L_1 (Fig. 9-10).

Modelarea cariei dentare în 1 serie de experiențe a avut un impact cariogen semnificativ, numărul de cavități carioase per animal în L_1 fiind de 4,10±0,366, $p<0,001$, numărul de suprafețe cariate/animal — 5,2±0,530, $p<0,001$, spre deosebire de lotul de control (Tab. 2). Conform opiniei mai multor autori modelarea cariei dentare a avut un impact cariogen suficient în cazul când frecvența cariei dentare în lotul de animale depășește 80%-85% [8, 9]. Astfel, gradul înalt de afectare prin carie dentară estimat la animalele din L_1 este echivalat cu riscul carios mare/extrem și suficient pentru a compara eficiența metodelor cariopreventive studiate în seriile experimentale ulterioare.

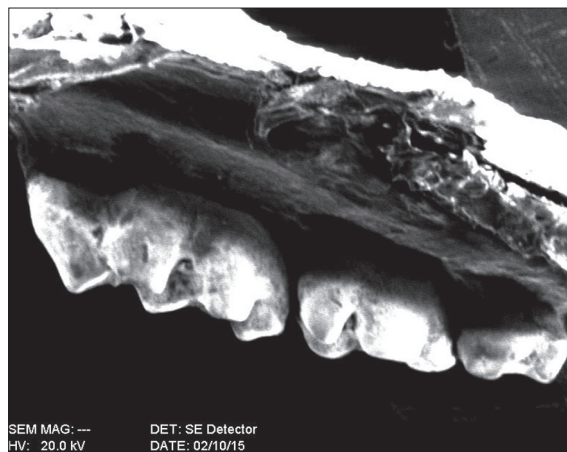


Fig.1. Imagine obținută prin metoda SEM a suprafețelor jugale și proximale a molarilor intacti

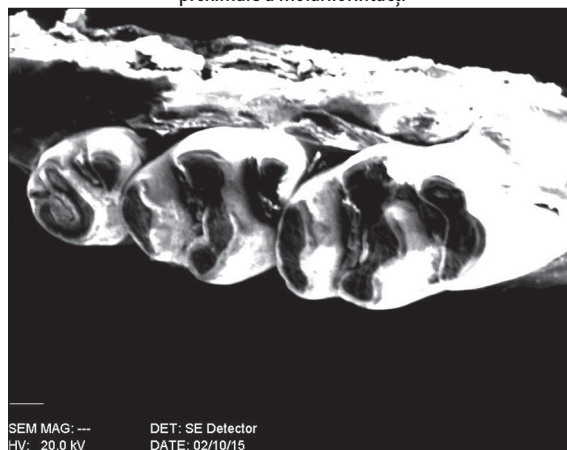


Fig. 2. Imagine SEM a suprafețelor masticatorii a molarilor intacti

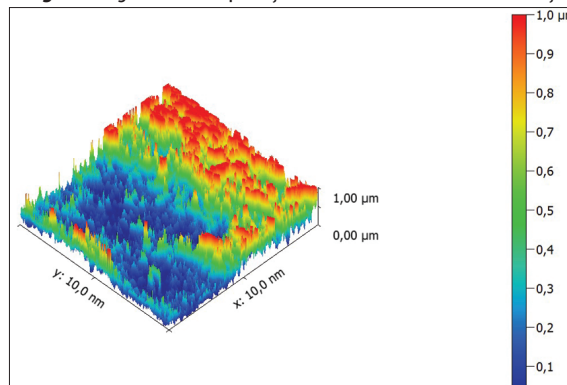


Fig. 3. Imagine AFM a suprafeței externe a smalțului unui molar intact

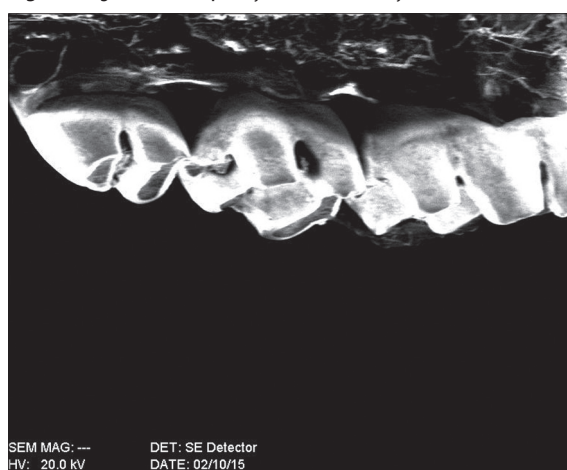


Fig. 4. Imagine SEM. Afectarea prin carie a molarilor

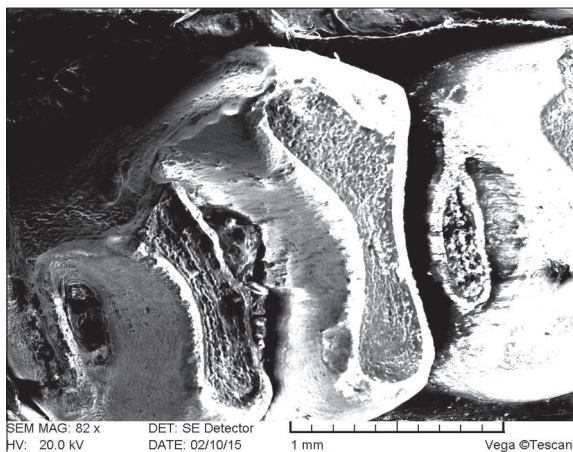


Fig. 5. Imagine SEM. Afectarea prin carie a suprafețelor masticatorii și proximale ale molarilor

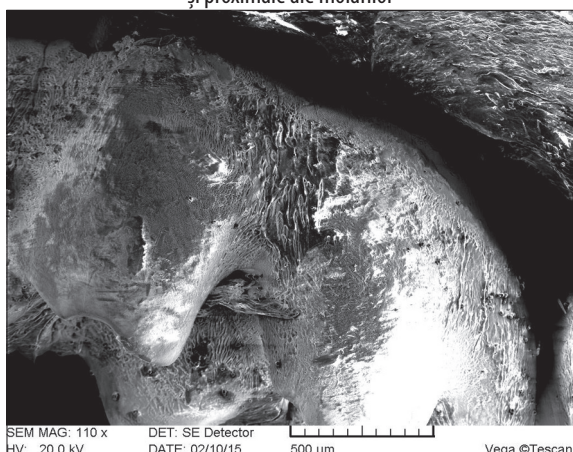


Fig. 6. Imagine SEM. Afectarea prin carie a molarilor

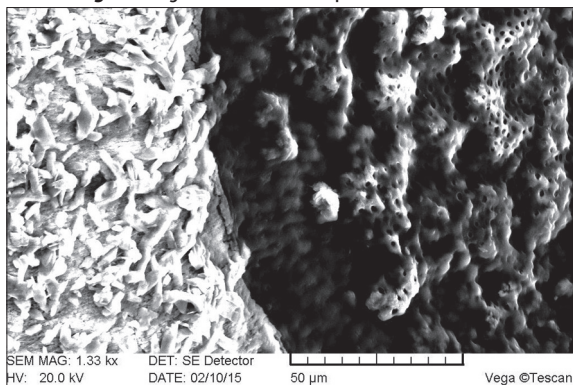


Fig. 7. Imagine SEM. Zonă de demineralizare a smalțului unui molar

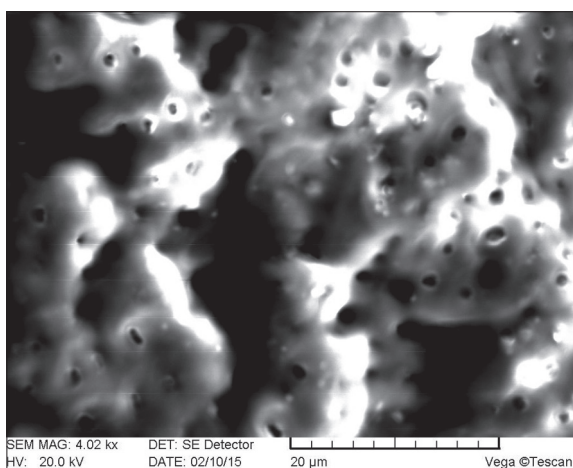


Fig. 8. Imagine SEM. Zonă de demineralizare a smalțului unui molar

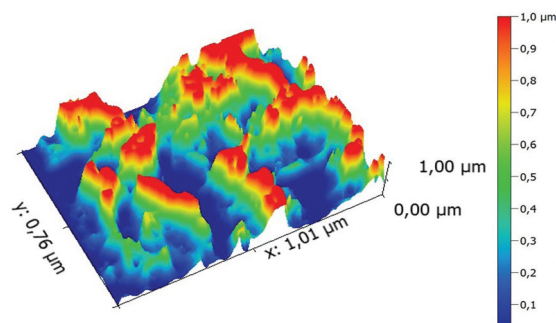


Fig. 9. Imagine MFA. Zonă de demineralizare a smalțului unui molar

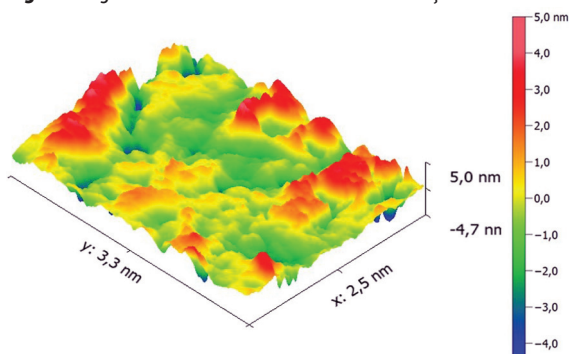


Fig. 10. Imagine MFA. Carie incipientă a unui molar

În seria II de experiențe a fost evaluată eficiența cariopreventivă a utilizării preparatelor pentru aplicarea topică. La toate animalele a fost modelată caria dentară prin metoda expusă anterior. Pentru prevenirea cariiei dentare la șobolanii din L_2 a fost aplicată topic prin tamponament ușor 0,1 ml suspensie de nanoparticule de dioxid de titan 1%, propus de cercetătorii Centrului Național de Cercetare și Testare a Materialelor a Universității Tehnice a Moldovei [10]. S-a aplicat topic prin tamponament ușor 0,5 ml extract antocianic 5,0 % (pH 8,0-9,0) elaborat și preparat în cadrul Institutului de Tehnologie a Alimentației al AȘM la animalele din L_3 [11]. La animalele din L_4 a fost aplicată topic 0,1 ml soluție Biomineralizantă SnF_3 1,0% (complexe ale SnF_3 cu baze Schiff) elaborată de savanții Institutului de Microbiologie și Biotehnologie și Institutului de Chimie al AȘM) [12]. Preparatul pentru fluorizarea profundă a smalțului dentar Glufluor *Vladmiva* (Rusia) care conține un complex de nanofluoruri a fost aplicat prin tamponament ușor o dată în săptămână în L_5 .

Rezultatele evaluării eficienței aplicării topice a preparatelor studiate sunt prezentate în tabelul 3. După 60 de zile de observație cea mai mare frecvență a cariiei a fost estimată în L_2 la 86,67±6,21 % din șobolani la care a fost aplicată topic suspensia de 1% dioxid de titan. Totodată, în rezultatul tratamentului preventiv efectuat, numărul cavităților carioase s-a redus semnificativ ($p < 0,001$), de 1,981 ori în raport cu lotul martor L_1 . O acțiune cariopreventivă similară a exercitat extractul antocianic (L_3) reducerea numărului cavităților carioase fiind de 1,62 ($p < 0,01$) în comparație cu L_1 . În urma aplicării topice a nanoparticulelor de dioxid de titan și a extractului antocianic nu s-au depistat modificări specifice a suprafeței smalțului dentar la cercetarea electronoptică SEM și prin scanarea tridimensională MFA, aceste substanțe având acțiuni bacteriostatice

Tab. 3. Gradul de afectare prin caria dentară și rugozitatea smalțului dentar a animalelor de laborator în II serie de experiențe

Loturile de studiu	Frecvența cariei dentare P±ES%	Nr cavități carioase / animal, M±ES	Nr suprafețe cariate/ animal, M±ES	Rugozitatea (μm), M±ES
L ₀	3,33±3,28	0,03±0,033	0,03±0,033	1,17±,084
L ₁	93,33±4,55	4,10±0,366	5,2±0,530	6,47±,481 ^{ooo}
L ₂	86,67±6,21	2,07±0,235 ^{ooo***}	2,67±0,363 ^{ooo***}	3,03±,360 ^{ooo**}
L ₃	83,33±6,80	2,53±0,317 ^{ooo**}	3,47±0,469 ^{ooo*}	3,43±,446 ^{ooo***}
L ₄	76,67±7,72	2,3±0,300 ^{ooo***}	2,95±0,382 ^{ooo***}	2,73±,258 ^{ooo***}
L ₅	66,67±8,61	1,83±0,311 ^{ooo***}	2,57±0,428 ^{ooo***}	2,57±,286 ^{ooo***}

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul de control, L₀: ° — p<0,05; °° — p<0,01; °°° — p<0,001.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor, L_i: * — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001.

asupra bacteriilor cariogene, inclusiv *Streptococcus-Mutans* din componența biofilmului dentar, fapt demonstrat în cadrul etapei *in vitro* a cercetării.

În urma aplicării topice a soluție Biomineralizante SnF₃ la animalele de laborator din L₄ numărul cavităților carioase s-a redus semnificativ (p<0,001), de 1,783 ori în raport cu lotul martor L₁. Reducerea semnificativă a gradului de afectare prin caria dentară la animalele de laborator din lotul L₄ (p<0,001) comparativ cu lotul martor (L₁) poate fi explicat prin acțiunea anti-microbiană [12], antiinflamatoare și antioxidantă [13, 14] exercitată de complexul SnF₃ cu compuși de tip baza Schiff. La suprafața smalțului s-a depistat depozitarea cristalelor cu dimensiuni 6-8 μm (Fig. 11, 12) și reducerea rugozității de suprafață de la o medie a valorilor rugozității de 6,47±,481 μm în L₁ la 2,73±,258 μm, p<0,001 în L₄.

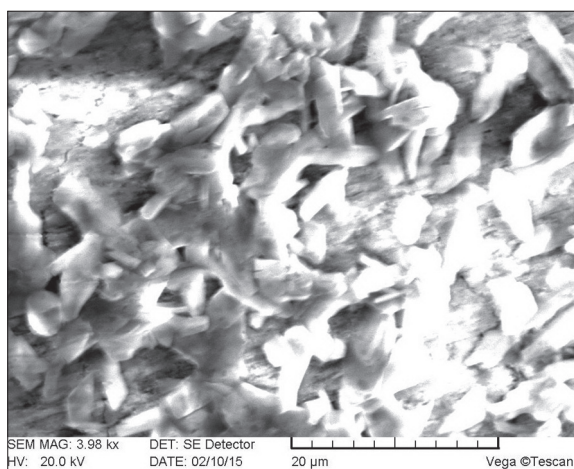


Fig. 11. Imagine SEM. Cristale depozitate la suprafața smalțului unui molar intact

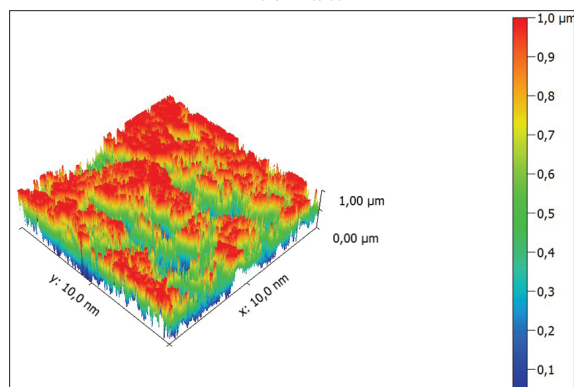


Fig. 12. Imagine MFA. Cristale depozitate la suprafața smalțului unui molar

Aplicarea topică a preparatului Gluftored care conține un complex de nanofluorurila șobolanii din L₅ s-a soldat cel mai mare efect cariopreventiv din această serie de experiențe, reducerea numărului cavităților carioase fiind de 2,224 (p<0,001) în raport cu lotul martor (L₁). La scanarea tridimensională a probelor de smalț s-a constatat reducerea semnificativă a rugozității de suprafață de la 6,47±,481 μm în L₁ la 2,57±,286 μm (p<0,001) în L₅ datorită depozitării unui strat protector de fluoruri la suprafața și în defectele smalțului (Fig. 13, 14). Datele noastre confirmă rezultatele cercetărilor efectuate de prof. Adolf Knappvost, care în urma fluorizării profunde a smalțului cu aplicarea nanofluorurilor a depistat formarea microcristalelor de fluorură de calciu (CaF₂), fluorură de magneziu (MgF₂), hidrofluorură de cupru (Cu(OH)F) și acid silicic. Dimensiunea microcristale de CaF₂ constituie circa 5 nm, fiind redusă considerabil comparativ cu cristalele de CaF₂, care se formează ca urmare a reacției fluorurilor simple cu hidroxiapatita. Dimensiunea redusă a microcristalelor de CaF₂ este criteriul esențial care definește proprietățile superioare de remineralizare a nanofluorurilor [15, 16].

În III serie de experiențe a fost evaluată eficiența cariopreventivă a metodelor fizice, de iradiere a smalțului dentar cu lumină laser sau LED. La toate animalele a fost modelată caria dentară prin aceeași metodă ca și în seriile precedente. Pentru prevenirea cariei dentare la șobolanii din L₆, suprafețele dinților s-au iradiat cu dispozitivul *OptodanALST-01*, Vend, Rusia, cu emițător semiconductor pe bază de arseniat de galiu (GaAs) având un regim impulsiv de generare, λ=850-980 nm- diapazonul de lungimi de undă infraroșii (LIR), frecvența 2000-3000 Hz și puterea impulsului 5 W, durata expunerii fiind de 60 s. Iradierea timp de 30 s cu lumină LED, λ= 625-635 nm și puterea impulsului 2,0 — 3,0 W emisă de dispozitivul *FotoSan 630 LAD pen* (CMS Dental, Denmark).

În urma iradierii smalțului cu LIR la animalele de laborator din L₆ s-a redus semnificativ gradul de afectare prin caria dentară (p<0,001) în raport cu lotul martor L₁ (Tab. 4) În lotul L₆, iradierea smalțului cu lumină LED, λ= 625-635 nm a exercitat un efect cariopreventiv similar. În urma aplicării metodelor fizice de prevenire a cariei dentare la cercetarea electronoptică SEM nu s-a depistat modificarea structurii suprafeței smalțului dentar. Totodată, prin scanarea tridimensională MFA a suprafeței smalțului

Tab. 4. Gradul de afectare prin caria dentară și rugozitatea smalțului dentar a animalelor de laborator în III serie de experiențe

Loturile de studiu	Frecvența cariei dentare P±ES%	Nr cavități carioase / animal, M±ES	Nr suprafețe cariate/ animal, M±ES	Rugozitatea (μm), M±ES
L ₀	3,33±3,28	0,03±0,033	0,03±0,033	1,17±,084
L ₁	93,33±4,55	4,10±0,366 ^{ooo}	5,2±0,530 ^{ooo}	6,47±,481 ^{ooo}
L ₆	73,33±8,07	2,07±0,346 ^{ooo***}	2,23±0,341 ^{ooo***}	2,77±,317 ^{ooo***}
L ₇	80,00±7,30	2,77±0,373 ^{ooo}	3,57±0,469 ^{ooo*}	2,57±0,228 ^{ooo***}

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul de control, L₀: ^o — p<0,05; ^{oo} — p<0,01; ^{ooo} — p<0,001.
Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor, L₁: * — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001.

s-a depistat reducerea semnificativă a rugozității de la 6,47±,481 μm în L₁ la 2,57±,286 μm (p<0,001) în L₆ și la 2,57±0,228 μm (p<0,001) în L₇.

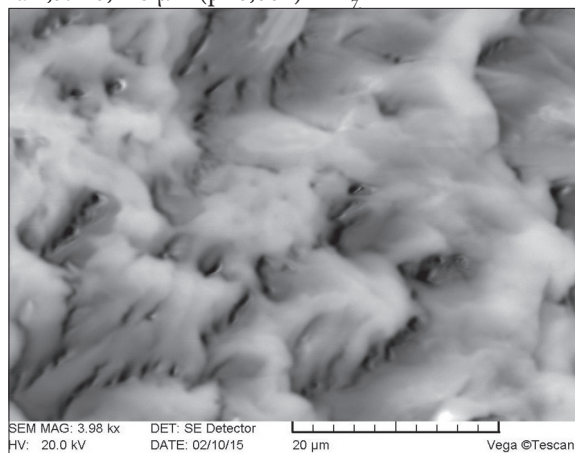


Fig. 13. Imagine SEM. Depozitarea unui strat protector de fluoruri la suprafața smalțului unui molar în urma aplicării topice a nanofluorurilor

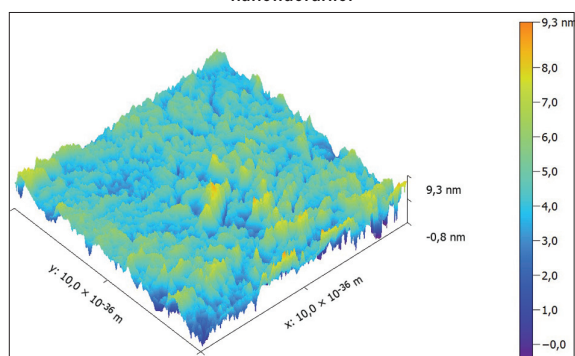


Fig. 14. Imagine MFA. Suprafața smalțului unui molar în urma aplicării topice a nanofluorurilor

Efectul carioprotector al iradierii cu lumină laser sau LED în diapazonul de lungimi de undă roșii/ infraroșii poate fi explicat prin prisma teoriei cuantice a legăturilor chimice, fiind datorat acțiunii fotonilor asupra rețelei cristaline a smalțului dentar. Astfel, fluxul de fotoni, generați de sursa de iradiere laser/LED, activează matricea proteică a țesuturilor dure dentare și contribuie la accelerarea proceselor de schimb ionic și de difuzie în smalț [9, 17]. Conform datelor expuse de Бебеликов А., 2009, și Прохончуков А., 2003, laserul cu diapazonul de lungimi de undă roșii are o penetrare intratisulară de 2-3 cm, după care intensitatea și eficiența terapeutică scad [17, 18]. Cercetările efectuate de Anderson A. și coaut., 2002, Esteves-Oliveira M. și coaut., 2009, au arătat că iradierea cu raze roșii/ infraroșii exercită o acțiune de activare a structurilor

moleculare proteice, modifică conformația proteinelor matricei smalțului, fapt care intensifică procesele metabolice și de difuzie [19, 20] și astfel se majorează rezistența smalțului la acțiunea factorilor acidogeni. Acțiunea iradierii laser/LED asupra pulpei dintelui se manifestă prin stimularea funcției secretorii a odontoblaștilor și a microcirculației, fapt care în ultimă instanță induce creșterea proceselor metabolice în țesuturile dentare [9, 20].

Așadar, în rezultatul aplicării remediilor pentru profilaxia exogenă a cariei dentare și a metodelor cariopreventive fizice la animalele de laborator în II și III serii experimentale s-au redus semnificativ afectarea prin carie dentară și rugozitatea smalțului dentar în raport cu lotul martor (L₁), în aceste serii experimentale s-au depistat și diferențe semnificative a indicatorilor menționați în raport lotul de control (L₀), fapt care indică la insuficiența eficienței în prevenirea cariei dentare a remediilor și metodelor studiate. Prin urmare, este necesară studiarea în continuare a oportunităților de majorare a eficienței măsurilor preventive care să asigure un efect carioprotector superior.

Seria IV de experiențe a fost efectuată pentru evaluarea eficienței aplicării terapiei fotodinamice antimicrobiene (TFDA) în prevenirea cariei dentare. Această metodă se bazează pe reacții fotochimice declanșate de interacțiunea unei substanțe fotosensibile și lumină cu o anumită lungime de undă, având ca rezultat formarea de speciilor reactive ale oxigenului (SRO) care induc distrugerea bacteriilor [3]. Efectuarea studiului pe animale de laborator a fost precedată de cercetări efectuate *in vitro*, care ne-au permis să stabilim concentrația agenților de fotosensibilizare și durata iradierii LED pentru obținerea unui efect cariopreventiv maxim [21]. La toate animalele a fost modelată caria dentară prin aceeași metodă ca și în seriile precedente. Pentru prevenirea cariei dentare la șobolanii din L₈ a fost efectuată TFDA: În calitate de agent de fotosensibilizare a fost propus extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0) aplicat prin tamponament ușor pe timp de 5 min după care suprafețele dentare au fost iradiate cu lumină (LED), cu emisia $\lambda = 625-635$ nm timp de 30 s. În scopul majorării eficienței TFDA în prevenirea cariei dentare, în lotul L₉ simultan cu TFDA a fost aplicat preparatul Glufluor-red care conține nanofluoruri.

Eficiența efectuării TFDA cu aplicarea soluției pentru fotosensibilizare autohtonă (extractul antocianic) în lotul experimental L₁₀ s-a utilizat în calitate de substanță fotosensibilă (etalon) gelul cu un grad

Tab. 5. Gradul de afectare prin caria dentară și rugozitatea smalțului dentar a animalelor de laborator în IV serie de experiențe

Loturile de studiu	Frecvența cariei dentare $P \pm ES\%$	Nr cavități carioase / animal, $M \pm ES$	Nr suprafețe cariate/ animal, $M \pm ES$	Rugozitatea (μm), $M \pm ES$
L_0	$3,33 \pm 3,28$	$0,03 \pm 0,033$	$0,03 \pm 0,033$	$1,17 \pm 0,084$
L_1	$93,33 \pm 4,55$	$4,10 \pm 0,366^{ooo}$	$5,2 \pm 0,530^{ooo}$	$6,47 \pm 0,481^{ooo}$
L_8	$13,33 \pm 6,21$	$0,63 \pm 0,305^{***}$	$0,87 \pm 0,414^{***}$	$1,73 \pm 0,225^{***}$
L_9	$6,67 \pm 4,55$	$0,47 \pm 0,328^{***}$	$0,53 \pm 0,383^{***}$	$1,27 \pm 0,185^{***}$
L_{10}	$16,67 \pm 6,80$	$0,8 \pm 0,340^{o***}$	$0,87 \pm 0,38^{o***}$	$1,70 \pm 0,174^{oo***}$
L_{11}	$6,67 \pm 4,55$	$0,5 \pm 0,348^{***}$	$0,53 \pm 0,371^{***}$	$1,30 \pm 0,21^{***}$

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul de control, L_0 : $^o - p < 0,05$; $^{oo} - p < 0,01$; $^{ooo} - p < 0,001$.
Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor, L_1 : $^* - p < 0,05$; $^{**} - p < 0,01$; $^{***} - p < 0,001$.

reus de vâscozitate FotoSan AgentLow care conține albastru de toluidină. Iradierea smalțului s-a produs cu lumină LED în același regim. Pentru comparare, în lotul L_{11} s-a efectuat TFDA cu aplicarea gelului FotoSan AgentLow și iradierea cu lumină LED în regimul descris, simultan cu aplicarea preparatului Gluftored.

În urma efectuării TFDA la animalele de laborator din L_8 s-a redus semnificativ gradul de afectare prin caria dentară ($p < 0,001$) în raport cu lotul martor L_1 (Tab. 5). Rezultate similare s-au estimat și în loturile experimentale L_{10} . Totodată, nu s-au depistat diferențe semnificative ($p > 0,05$) între afectarea prin carie în lotul L_8 și lotul de control (L_0), fapt care demonstrează un efect cariopreventiv superior celui estimat la animalele din lotul L_{10} . În urma aplicării metodelor TFDA indiferent de agentul de fotosensibilizare utilizat, nu s-a depistat modificarea structurii suprafeței smalțului dentar la cercetarea electronoptică SEM. Prin scanarea tridimensională MFA a suprafeței smalțului s-a depistat reducerea semnificativă a rugozității până la $1,73 \pm 0,225 \mu m$ ($p < 0,001$) în L_8 și la $1,70 \pm 0,174 \mu m$ ($p < 0,001$) spre deosebire de lotul martor $6,47 \pm 0,481 \mu m$.

Efectuarea TFDA simultan cu aplicarea topică a nanofluorurilor la șobolanii din loturile L_9 și L_{11} s-a soldat cu mai mare efect cariopreventiv din toate seriile experimentale, reducerea numărului cavităților carioase fiind în L_9 de 8,723 ori ($p < 0,001$), iar în L_{11} — de 8,2 ori ($p < 0,001$) în raport cu lotul martor (L_1). Mai mult, între gradul de afectare prin carie dentară în L_9 și L_{11} nu s-au depistat diferențe semnificative ($p > 0,05$) în raport cu lotul de control (L_0), fapt care indică la o eficiență cariopreventivă mai mare a efectuării TFDA simultan cu aplicarea topică a nanofluorurilor. La suprafața smalțului s-a depistat depozitarea unui strat protector omogen constituit din microcristale de CaF_2 , MgF_2 , $(Cu(OH)F)$ cu dimensiunile de circa 5 nm (Figurile 15, 17) și reducerea rugozității de suprafață (Figurile 16, 18) până la $1,27 \pm 0,185 \mu m$ în L_9 la $1,30 \pm 0,21 \mu m$, $p < 0,001$ în L_{11} , datele fiind semnificative ($p < 0,001$) în raport cu lotul martor (L_1 : $6,47 \pm 0,481 \mu m$) și nesemnificative ($p > 0,05$) în raport cu lotul de control (L_0 : $1,17 \pm 0,084$). Reducerea semnificativă a rugozității smalțului minimizează condițiile pentru aderarea biofilmului dentar și indică la un grad înalt de mineralizare.

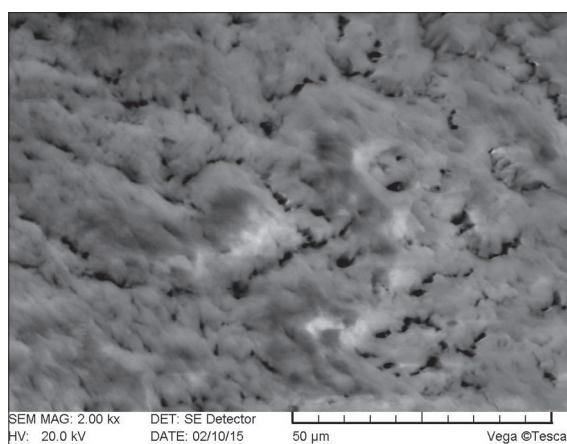


Fig. 15. Imagine SEM. Depozitarea unui strat protector de fluoruri la suprafața smalțului unui molar în urma efectuării TFDA și aplicării simultane a nanofluorurilor

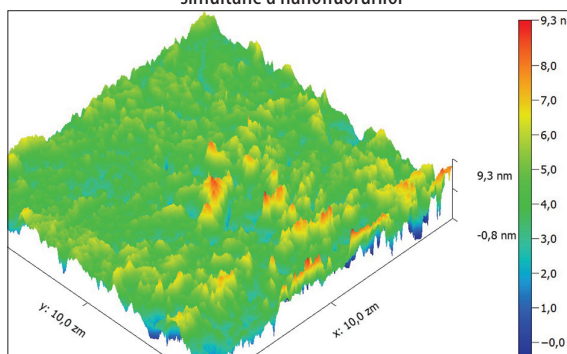


Fig. 16. Imagine MFA. Depozitarea unui strat protector de fluoruri la suprafața smalțului unui molar în urma efectuării TFDA și aplicării simultane a nanofluorurilor

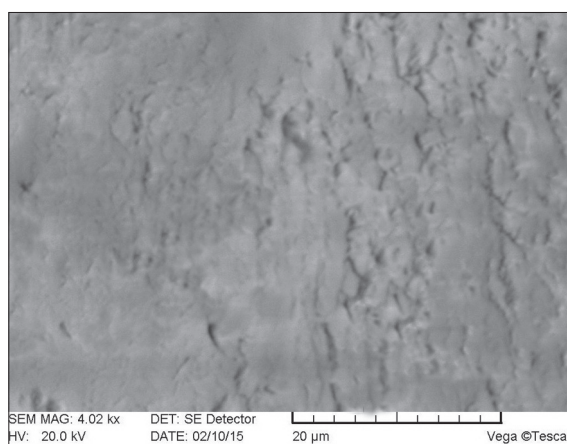


Fig. 17. Imagine SEM. Depozitarea unui strat protector de fluoruri la suprafața smalțului unui molar în urma efectuării TFDA și aplicării simultane a nanofluorurilor

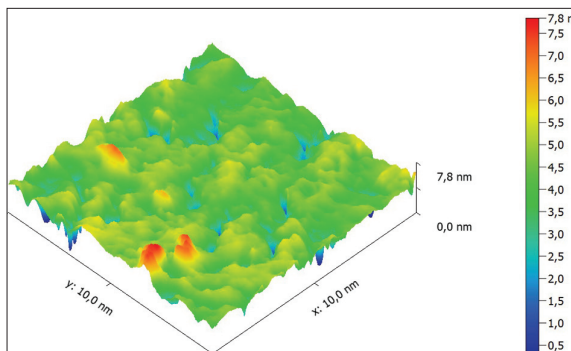


Fig. 18. Imagine MFA. Depozitarea unui strat protector de fluoruri la suprafața smalțului unui molar în urma efectuării TFDA și aplicării simultane a nanofluorurilor

Eficiența cariopreventivă a remediilor și metodelor aplicate la animalele de laborator în II și III seriile experimentale II-IV a fost evaluată prin estimarea indicelui de reducere (IR) a cariei dentare în loturile experimentale (L_2 - L_{11}) în raport cu lotul martor (L_1). Rezultatele estimării acestui indice sunt reprezentate în figura 19. Astfel, un efect cariopreventiv suficient, a fost estimat în loturile experimentale L_8 și L_{10} , în urma efectuării TFDA, IR fiind mai mare de 80%. Cele mai eficiente metode care au contribuit la reducerea maximă a cariei dentare au fost efectuarea TFDA cu aplicarea simultană a nanofluorurilor, IR în L_9 fiind de 88,61% și 87,81% în L_{11} .

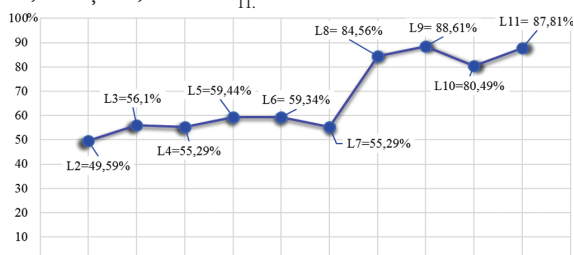


Fig. 19. Indicele de reducere a cariei dentare în loturile experimentale (L_2 - L_{11}) în raport cu lotul martor (L_1)

Efectul cariopreventiv al TFDA efectuate simultan cu aplicarea topică a nanofluorurilor se explică prin acțiunea de anihilare a bacteriilor acidogene, depozitarea microcristalelor de CaF_2 cu dimensiuni reduse la suprafața smalțului care definește proprietățile superioare de remineralizare a nanofluorurilor. Mai mult, iradierea suprafeței smalțului cu LED (625-635 nm) și aplicarea simultană a nanofluorurilor creează condiții optime pentru penetrarea ionilor de fluor nu doar la suprafață, dar și în profunzimea smalțului și incorporarea lor în rețeaua cristalină a acestuia. Acest fapt se datorează acțiunii iradierii LED asupra pulpei dintelui care se manifestă prin stimularea funcției secretorii a odontoblaștilor și a microcirculației, fapt care în ultimă instanță induce creșterea proceselor metabolice și de difuzie, inclusiv contribuie la o mai bună penetrare a ionilor de fluor în smalțul dentar [18-21], majorând astfel rezistența smalțului la acțiunea factorilor cariogeni.

Actualmente TFDA este o alternativă în curs de dezvoltare pentru tratamentul infecțiilor localizate [22-24], a afecțiunilor cavității orale [25], parodontitei [22,

26-28], abordarea adjuvantă pentru tratamentul cariei dentare [29-30] și a complicațiilor acesteia [31, 32]. În pofida utilizării tot mai frecvente a TFDA în stomatologie și numărul impunător de studii care atestă rezultate remarcabile de inactivare a celulelor microbiene în condiții *in vitro*, sunt foarte puține studii care vizează utilizarea TFDA în complexul de măsuri cariopreventive efectuate în condiții clinice.

Concluzii

1. Metoda de modelare a cariei dentare utilizată la animalele de laborator a avut un efect cariogen major, soldată cu afectarea a $93,33 \pm 4,55\%$ din șobolani nesușiți tratamentului preventiv, rezultatul fiind suficient pentru a compara eficiența metodelor cariopreventive studiate.
2. Metodele de prevenire a cariei dentare bazate pe aplicații topice a preparatelor non-fluorate și fluorate, precum și iradierile smalțului dentar cu lumină laser, $\lambda=850-980$ nm sau LED, $\lambda=625-635$ nm nu au avut un efect cariopreventiv suficient la animalele de laborator cu risc carios mare, indicele de reducere a cariei dentare în raport cu lotul martor (IR) fiind $< 80\%$.
3. În cadrul studiului experimental efectuat pe animale de laborator, s-a demonstrat efectul cariopreventiv suficient al efectuării TFDA (IR $> 80\%$) și superior al efectuării TFDA simultan cu aplicarea topică a nanofluorurilor (IR $> 85\%$), fapt care justifică oportunitatea implementării ulterioare a metodelor studiate în condiții clinice la persoanele cu risc carios mare sau extrem.

Bibliografie

1. Peters M. C. „Strategies for noninvasive demineralized tissue repair“, Dent. Clin. North Am., Nr.54/2010, pp. 507-525.
2. Adrian S. Sistemul internațional de clasificare și management al bolii carioase: recomandări clinice și terapeutice. Colegiul Medicilor Dentisti, Cluj-Napoca, 2015. <http://emc.cmdcluj.ro/schedule/conferinta-2/>.
3. Baptista A., Kato I., Prates R., Suzuki L., Rael M., Freitas A., Ribeiro M. „Antimicrobial Photodynamic Therapy as a Strategy to Arrest Enamel Demineralization: A Short-Term Study on Incipient Caries in a Rat Model“, Photochemistry and Photobiology, Nr.88/2012, pp. 584-589.
4. Bowen W. H., Lawrence R. A. „Comparison of the cariogenicity of cola, honey, cow milk, human milk, and sucrose“, Pediatrics, Nr.116/2005, pp. 921-926.
5. Muller K. P., Rodrigues C. R., Nunez S. C., Rocha R., Jorge A. O., Ribeiro M. S. „Effects of low powered laser on induced dental caries in rats“, Arch. Oral Biol., Nr.52,(7)/2007, pp.648-654. [http://www.aobjournal.com/article/S0003-9969\(07\)00019-2/abstract](http://www.aobjournal.com/article/S0003-9969(07)00019-2/abstract).
6. Decun M., Bodnariu A. „Experimentarea pe animale în România, analiza din perspectivă europeană“, Revista Română de Bioetică, Vol. 7, Nr. 3/2009, pp. 17-27.
7. Thurnheer T., Giertsen E., Gmu R., Guggenheim B. „Cariogenicity of soluble starchin oral in vitro bio film and experimental rat caries studies: a comparison“, Journal of Applied Microbiology, Nr.105 (5)/2008, pp. 829-836 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2008.03810.x/pdf>.
8. Лолаева А. Клинико-экспериментальное применение зубных эликсиров для лечения и профилактики заболеваний полости рта. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Ставрополь, 2011, 20 с.
9. Алябьев Ю. Экспериментальные исследования способов профилактики и лечения начальных форм кариеса зубов с применением лазерного света. Автореферат диссертации на

- соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Москва, 2002, 19 с.
10. Brevet de invenție. 227 Z, MD, C01G 23/047, C01G 23/08, B82B 3/00, C25B 1/00. Procedeu de obținere a dioxidului de titan nanodispers (variante). Covaliova Olga, Enachi Mihail (MD). Data eliberării brevetului 28.02.2011.
 11. Sturza A., Deseatinicova O. „Optimisation of the extract of polyphenols from grape seeds”, J. of Food and Environment Safety of the Suceava University. Food Engineering. Year IX, Nr.3/2010, pp. 59-65.
 12. Gulea A., Poirier D., Roy J., Stavila V., Bulimestru I., Tapcov V., Birca M., Popovschi L. „In vitro antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: chemical-synthesis and structure — activity relationships”, J Enzyme Inhib Med Chem., Nr.23(6)/2008, pp.806-818.
 13. Kamiński K., Zagaja M., Łuszczki J.J., Rapacz A., Andres-Mach M., Latacz G., Kieć-Kononowicz K. „Design, synthesis, and anticonvulsant activity of new hybrid compounds derived from 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) propanamides and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) butanamides”, J Med Chem., Nr.58(13)/2015, pp.5274-5286.
 14. Andronache Lilia Influența unor compuși biologici activi autohoni asupra ciclului glutatonic în normă și în patologia hepatică experimentală. Autoreferatul tezei de doctor în științe medicale, Chișinău, 2016, 26 p.
 15. Кнаппвост А. Постоянная защита пульпы от дентинного кариса наноторидами при глубоком фторировании и дентин-герметизировании. В кн: Маэстро стоматологии. 2000, р. 44-46.
 16. Кнаппвост А. „Молочные зубы и их лечение”, Институт стоматологии, Nr.3/2001, pp. 22-23.
 17. Бебеликов А.В. Лазерные биомедицинские технологии (часть 2): Учебное пособие. А.В.Беликов, А.В. Скрипник. СПбГУ ИТМО, 2009, 100 p.
 18. Прохончуков А.А. „Комплекс лазерной техники новых поколений авторских патентованных методик для лечения стоматологических заболеваний”, Стоматология для всех, Nr.1/2003, pp.10-12.
 19. Anderson A., Kao E., Gladwin M. și alții. „The effects of argon laser irradiation on enamel decalcification: An in vivo study”, Am J Orthod Dentofacial Orthop, Nr.122(3)/2002, pp. 251-259.
 20. Esteves-Oliveira M., Zetzl D.M., Meister J. și alții. „CO2 Laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel”, Caries Res., Nr.43(4)/2009, pp. 261-268.
 21. Spinei A., Spinei I. „Efectul in vitro al terapiei fotodinamice asupra biofilmului dentar”, Medicina Stomatologică, Nr. 3 (28)/2013, pp. 99-106, ISSN 1857—1328.
 22. Prates R. A., Yamada A. M., Suzuki L. C., Franca C. M., Cai S., Mayer M. P., Ribeiro A. C., Ribeiro M. S. „Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: A short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model”, Photomed. Laser Surg., Nr.29/2011, pp. 835-844.
 23. Marotti J., Aranha A. C., Eduardo P., Ribeiro M. S. „Photodynamic therapy can be effective as a treatment for herpes simplex labialis”, Photomed. Laser Surg., Nr.27/2009, pp. 357-363.
 24. Hayek R. R., Araujo N. S., Gioso M. A., Ferreira J., Baptista-Sobrinho C. A., Yamada A. M., Ribeiro M. S. „Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced periodontitis in dogs”, J. Periodontol., Nr.76/2005, pp. 1275-1281.
 25. Konopka K., Goslinski T. „Photodynamic therapy in dentistry”, J. Dent. Res., Nr.86/2007, pp. 694-707.
 26. Lulic M., Leiggener Gorog I., Salvi G. E., Ramseier C. A., Mattheos N., Lang N. P. „One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: A proof-of-principle randomized-controlled clinical trial”, J. Clin. Periodontol., Nr.36/2009, pp.661-666.
 27. Braun, A., Dehn C., Krause F., Jepsen S. „Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: A randomized clinical trial”, J. Clin. Periodontol., Nr.35/2008, pp. 877-884.
 28. de Oliveira R. R., Schwartz-Filho H. O., Novaes Jr. A. B., Taba Jr. M. „Antimicrobial photodynamic therapy in the nonsurgical treatment of aggressive periodontitis: A preliminary randomized controlled clinical study”, J. Periodontol., Nr.78/2007, pp. 965-973.
 29. Guglielmi, C. D., Simionato M. R., Ramalho K. M., Imparato J. C., Pinheiro S. L., Luz M. A. „Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions”, J. Biomed. Opt., Nr.16/2011, 088003.
 30. Ciancaglini, P., Paulino T. P., Magalhaes P. P., Thedei G., Tedesco A. C. „Use of visible light-based photodynamic therapy to bacterial photo inactivation”, Biochem. Mol. Biol. Edu., Nr.33/2005, pp.46-49.
 31. Garcez, A. S., Nunez S. C., Hamblin M. R., Ribeiro M. S. „Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulp and periapical lesion”, J. Endod., Nr.34/2008, pp.138-142.
 32. Garcez, A. S., Nunez S. C., Hamblin M. R., Suzuki H., Ribeiro M. S. „Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: A preliminary report”, J. Endod., Nr.36/2010, pp.1463—1466.

Data prezentării: 16.11.2016.
Recenzent: Gheorghe Nicolau